

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390070

研究課題名(和文)未分化性維持におけるBMPシグナルの役割

研究課題名(英文)Roles of BMP signaling in maintenance of cell stemness

研究代表者

宮園 浩平 (MIYAZONO, Kohei)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90209908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：BMP-4はマウスES細胞の未分化性維持に重要であるが、ヒトES細胞やマウスEpiSCではBMP-4により胚体外組織などへの分化が促進される。我々はBMP-4による未分化性維持にはSmad経路が必要不可欠ではないこと、転写因子KLF4がBMP-Smad1経路を阻害することを明らかにした。また、MEK5-ERK5経路が転写因子KLF2を誘導することで、マウスES細胞の自己複製に重要な働きを示すことを見出した。我々はさらに脳腫瘍幹細胞ではBMP-4が分化誘導を行うことを行うことを確認し、網羅的遺伝子解析の結果、転写因子PRRX1が分化誘導に重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の概要(英文)：BMPs are key serum-derived factors that act to sustain self-renewal and pluripotency of mouse ES cells. In contrast, human ES cells share defining features with mouse epiblast stem cells (mEpiSC). BMP-4 induces differentiation of mEpiSCs into extraembryonic lineage or mesendoderm. We found that the BMP-Smad pathway is dispensable for maintaining naive pluripotency, and that the transcriptional factor KLF4 plays a key role in the suppression of Smad1 activity. We also found that the MEK5-ERK5 pathway mediates BMP-4-induced self-renewal of mESCs by inducing KLF2. We have investigated the roles of BMPs in regulation of glioma-initiating cells (GICs). In the orthotopic transplantation model, BMP signaling repressed the tumorigenic activity through loss of stemness properties of GICs. We further performed DNA microarray and RNA-seq analyses to identify novel target genes of BMP signaling in GICs, and found that PRRX1 plays an important role in regulation of the differentiation of GICs.

研究分野：医化学一般

キーワード：細胞医化学 ゲノム医化学 細胞内シグナル伝達 発生医学

1. 研究開始当初の背景

BMP (bone morphogenetic proteins) は TGF- β (transforming growth factor- β)ファミリーに属するサイトカインで、骨形成誘導のみならず心血管系発生や鉄代謝などにおいて重要な役割を果たし、生体内で多彩な機能を担っている。TGF- β ファミリー分子のシグナルは、主に細胞内シグナル伝達因子である転写因子 Smad を介して伝達され、標的遺伝子の転写を調節することで機能を発揮する。また Smad を介さずに MAP キナーゼや PI3 キナーゼ経路等を活性化して細胞応答を惹起する非 Smad 経路も知られている。BMP シグナルの異常は、種々の遺伝性疾患や発がんなどの病態に関与することが知られている。

胚性幹細胞 (ES 細胞; embryonic stem cell) は自己複製能と生体を構成する全ての細胞に分化しうる多分化能を有する細胞である。人工多能性幹細胞 (iPS 細胞; induced-pluripotent stem cell) の樹立以来、ヒト ES 細胞および iPS 細胞が保持する多分化能は再生医療・移植医療の資源として注目を集め、広範な応用が期待されている。一方、ヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞は、マウス ES 細胞よりも発生段階が進みキメラ形成能を持たないマウス胚盤葉上層幹細胞 (EpiSC; epi-stem cell) と多くの共通点を持つことが明らかにされた。これらの細胞の差異を明らかにすることは、ES 細胞の自己複製能と多分化能維持機構に関する基本的な理解や、効率的な iPS 樹立法の開発に重要であると考えられている。

幹細胞の分野では、BMP-4 は白血病阻止因子 (LIF; leukemia inhibitory factor) とともにマウス ES 細胞の未分化性維持に重要であることが示されている。一方、ヒト ES 細胞やマウス EpiSC では、BMP-4 刺激により胚体外組織や中胚葉系への分化が促進されることが報告された。このように、BMP シグナルは未分化性維持・分化に関して 2 つの幹細胞で正反対の機能を果たすことが報告されている。さらに、TGF- β は上皮-間葉移行 (EMT; epithelial-mesenchymal transition) を起こすことでよく知られているサイトカインであるが、BMP シグナルが EMT の逆となる間葉-上皮移行 (MET; mesenchymal-epithelial transition) の機構を介して効率的な iPS 細胞樹立に関与していることが報告されており、幹細胞における BMP シグナルの分子機構を詳細に明らかにすることが、効率的な iPS 細胞樹立法開発や、より適切な ES/iPS 細胞維持法の解明に貢献すると考えられる。

これまで我々は、クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation; ChIP) - プロモータレイ (ChIP-chip)、クロマチン免疫沈降 - シークエンス法 (ChIP-seq 法)を導入することで、転写因子 Smad のゲノム上の結合領域を全ゲノ

ムレベルで解析し、TGF- β ファミリー分子の細胞種依存的な多彩な機能を果たす上で必要となる転写因子・転写共役因子を同定してきた (Koinuma et al. Mol Cell Biol 2009; Mizutani et al. J Biol Chem 2011; Morikawa et al. Nucleic Acids Res, 2011)。これらの結果から、ES 細胞・EpiSC における細胞種依存的な BMP シグナルの分子機構を解析する上で、ChIP-seq が極めて有効であることが示唆された。しかし、ChIP-seq 法で解析を行うためには 1 条件あたり多くの細胞が必要となるため、特に初代培養細胞である EpiSC の均質性が問題となる。また、ChIP-seq の結果を比較するにあたり、遺伝的背景が異なる細胞を比較する場合には解釈が難しくなることが次第に明らかになってきており、これまで ES 細胞・EpiSC の直接の比較が困難であった。

2. 研究の目的

BMP は TGF- β ファミリーに属するサイトカインで、生体内で多彩な機能を担っている。幹細胞の分野では、BMP-4 は LIF とともにマウス ES 細胞の未分化性維持に重要であることが示され、Smad 経路の既知標的遺伝子である Id1 の関与が指摘されている。しかしその後、この BMP の作用は permissive とされる遺伝的背景を持ったマウス ES 細胞に限定されることが明らかになってきた。また、ヒト ES 細胞やマウス EpiSC といったプライム状態の細胞では、BMP-4 刺激により胚体外組織や中胚葉系への分化が促進されることが報告されている。このように、BMP シグナルは幹細胞において未分化性維持と分化促進という正反対の作用を持つとされるが、その分子機構は明らかにされていなかった。また、Smad 経路が阻害される Smad4 ノックアウト ES 細胞が樹立され、初期状態で維持可能であることも報告されており、マウス ES 細胞における BMP-Smad 経路の役割について未解明の点が残されていた。

我々はこれまで、マウス ES 細胞の維持や分化における TGF- β ファミリー分子の役割に関する解析を行ってきた (Ogawa et al. J Cell Sci 2007)。こうした解析の過程で、マウス ES 細胞を特殊な条件で培養することで EpiSC 様細胞 (ESD-EpiSC) を分化・維持する培養法を導入することに成功し、EpiSC の代表的マーカーである Fgf5 を発現し、BMP-4 刺激で分化マーカーが誘導されることを確認した。この結果、遺伝的背景を揃えた条件で ES 細胞と ESD-EpiSC を比較することが可能となった。また、これまでに BMP シグナルの中心的なシグナル伝達分子である Smad1 や Smad5 (以下、Smad1/5) に関して ChIP-seq 可能な抗体を同定し、新規 Smad1/5 結合配列や細胞種特異的な BMP シグナルの標的

遺伝子に関して報告している (Morikawa et al. Nucleic Acids Res, 2011; Morikawa et al. Oncogene 2013)。抗 Smad1/5 抗体を用いて、既にマウス ES 細胞と ESD-EpiSC において ChIP-seq を施行し、全ゲノムレベルで Smad1/5 の結合領域を同定している。これらのデータの解析の過程で、同じ多能性幹細胞でありながら ES 細胞と ESD-EpiSC ではゲノム上への Smad1/5 結合領域が大きく異なり、他の転写因子との複合体を形成することで細胞特異的な Smad1/5 の結合パターンを示すことが予想された。

そこで本研究では、既に得られた ChIP-seq の結果より、Smad1/5 結合領域の DNA 配列からマウス ES 細胞、ESD-EpiSC 特異的に Smad1/5 シグナルの制御を行う転写因子を予想するとともに、マウス ES 細胞、ESD-EpiSC で RNA-seq を施行し、EMT の研究で広く使われているマウス乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞の知見と比較しつつ解析を行う。

さらに、幹細胞で得られた知見を基盤に、がん細胞・がん幹細胞における BMP シグナル異常のメカニズムの解析に応用することを目的として研究を行った。脳腫瘍の中でもグリオブラストーマは最も悪性度の高い固形腫瘍の一つであり、治療後の再発率が高いことから薬剤や放射線に抵抗性を示す脳腫瘍幹細胞の存在が指摘されてきた。脳腫瘍幹細胞を根絶する治療法の一つとして分化誘導療法が考えられ、分化を誘導する分子として BMP の作用が注目されている。しかしながらこれまで BMP シグナルによる分化誘導の詳細やその作用の分子メカニズムについては解明されていない。そこで脳腫瘍幹細胞において BMP によって誘導される遺伝子を次世代シーケンサーなどを用いて同定し、分化誘導における役割に関する研究を行った。

3. 研究の方法

1) マウス ES 細胞と EpiSC 様細胞における BMP シグナル経路の解析

本研究では、Smad1/5 結合領域の DNA 配列からマウス ES 細胞、ESD-EpiSC 特異的に Smad1/5 シグナルの制御を行う転写因子を予想するとともに、プロテオーム解析手法を用いて Smad1/5 結合蛋白を同定することを目指した。またマウス ES 細胞、ESD-EpiSC で RNA-seq を施行し、NMuMG 細胞のデータと比較をいろいろ、解析を行った。シグナルの解析には BMP-Smad 経路が強く活性化した細胞を排除するネガティブセレクション系や、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集法などを用いて研究を行った。また非 Smad 経路の解析には種々の低分子キナーゼ阻害剤を用いて候補となるキナーゼの同定を行った。BMP シグナルの検出には BMP 応答配列を有す

るレポーター遺伝子 BRE-Luc を用いて検討を行った。

2) 新規長鎖非コード RNA の同定と機能解析

ES 細胞や EpiSC 様細胞で RNA-seq を行った。さらに EMT のモデル系として確立された NMuMG 細胞でも同様の解析を行った。得られたデータから既知の遺伝子だけでなく長鎖非コード RNA の発現量やスプライシングバリエーションの評価、TGF- β ファミリー因子による調節を検討した。得られた長鎖非コード RNA のうち lncRNA-Smad7 について、その機能を in vitro や in vivo で検討した。

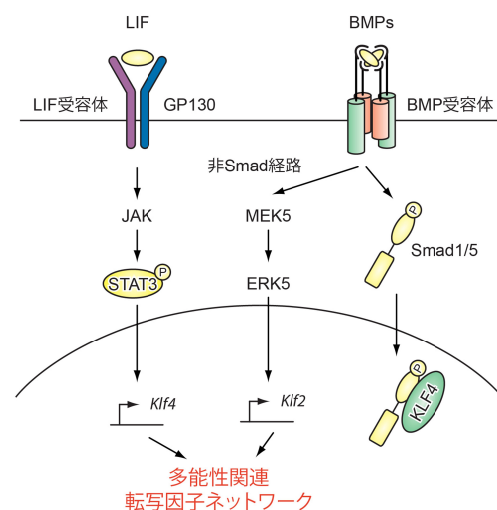
3) がん幹細胞における BMP シグナルの役割と未分化性維持

がん細胞・がん幹細胞における BMP シグナル異常のメカニズムの解析に応用することを目指し、研究を行った。ヒト脳腫瘍幹細胞 TGS-01 や TGS-04 を用いて DNA microarray や RNA-seq を行い、BMP-4 の標的遺伝子の同定を行った。さらに得られた標的遺伝子の脳腫瘍幹細胞の未分化性維持機構について in vitro および in vivo (脳内同所性移植モデル) を用いて検討を行った。

4. 研究成果

1) マウス ES 細胞と EpiSC 様細胞における BMP シグナル経路の解析

我々は、マウス ES 細胞と、マウス ES 細胞をヒト ES 細胞に類似したプライム状態まで分化させた細胞を用い、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析とゲノム編集の手法を駆使することで、マウス ES 細胞における BMP シグナルの役割に関して検討を行った。その結果、未分化性維持に Smad 経路が必要不可欠ではないことを明らかにした。また、非 Smad 経路と総称



されるシグナル伝達経路の中で、MEK5-ERK5経路がマウスES細胞の自己複製に重要であることを見出した(前ページ図)。

今回我々は、BMPに対して異なる応答性を認める2つの細胞(マウスES細胞と、マウスES細胞をヒトES細胞に類似したプライム状態まで分化させた細胞)の比較を通して、未分化性維持におけるBMPの役割の再評価を行った。クルッペル様(KLF; Krüppel-like factor)ファミリー転写因子のうちKLF2、KLF4、KLF5はES細胞に特徴的に発現し、EpiSCでは発現が低下することが報告されている。次世代シーケンサーを用いたRNA-seq法による全トランスクリプトーム解析、ChIP-seq法を用いたSmad蛋白(Smad1、Smad5)の結合領域の解析の結果、初期状態ではSmad1/5がKLFファミリーの転写因子のうちKLF4を介して間接的にゲノムを認識している可能性を見出した。さらにKLF4はBMP-Smad経路を阻害し、KLF4とSmad1が直接結合することを明らかにした。またBMP-Smad経路が強く活性化した細胞を排除するネガティブセレクション系や、CRISPR-Cas9によるゲノム編集法を駆使し、初期状態のマウスES細胞の維持にはSmad経路が必要不可欠ではないことを明らかにした。

一方、過去の報告で示された通り、BMPシグナル阻害タンパク質であるNogginが分化を促進することを確認し、既知の非Smad経路のなかでMEK5-ERK5経路がマウスES細胞の自己複製に重要であることを指摘した。さらに、MEK5-ERK5はKLF2を誘導し、KLF2がマウスES細胞の自己複製に重要な役割を果たしていることを示した。以上より、BMPがマウスES細胞で未分化性維持する場合、異なるKLF転写因子の異なる作用が重要であることを明らかにした。

今回の研究では、permissiveとされる遺伝的背景のマウスES細胞におけるBMPの役割を解析することを通じ、ES細胞の初期状態維持に関与しているシグナル伝達機構の詳細を明らかにした。特に、異なる遺伝的背景のマウスES細胞においてもMEK5-ERK5経路が自己複製を促進したため、今回の知見はより普遍的な現象である可能性も予想される。従って、今回の結果はより適切なES/iPS細胞維持法の開発や、より初期状態に近い高品質のヒトiPS細胞を樹立する手法の開発に寄与するものと考えられる。以上の成果を取りまとめたStem Cell Reports誌に発表した(Morikawa et al., 2016)。

なお、本研究の過程で、ES細胞においてSmad1/5とゲノム上で共局在が予想される転写因子に注目し解析を行った。そのなかでとくに転写因子Nr5a2について解析を行ったが、Nr5a2のノックダウン実験ではES細胞の未分化状態

に明らかな影響を与えず、類似の機能を持つ転写因子の重複の可能性が考えられた。またプロテオーム解析手法でES細胞、ESD-EpiSCに特異的にSmad1/5と結合するタンパク質の同定を試みた。Tandem Affinity Purification (TAP)法などを用いてSmad1/5結合タンパクの同定を試み、いくつかの候補タンパク質を見出したが、mRNAレベルではES細胞とEpiSC様細胞で発現量が同程度であったことからさらなる解析は行わなかった。

2) 新規長鎖非コードRNAの同定と機能解析

ES細胞やNMuMG細胞でRNA-seqを行い、既知の遺伝子だけでなく長鎖非コードRNAの発現量やスプライシングバリエーションの評価、TGF- β ファミリー因子による調節などについて検討を行った。マウス乳腺上皮細胞NMuMG細胞のデータの解析の結果、新規長鎖非コードRNAとしてlncRNA-Smad7を同定した。lnc-Smad7RNAはマウスSmad7遺伝子座の近傍に位置し、正常乳腺上皮細胞だけでなくマウス乳がん細胞においてもTGF- β で発現が誘導された。lncRNA-Smad7はTGF- β による抗アポトーシス作用に必要であるが、TGF- β によるEMTの誘導には影響を与えなかった。lncRNA-Smad7の機能を個体レベルでも評価するため、lncRNA-Smad7をノックダウンした乳がん細胞をヌードマウスの皮下に移植し、がん細胞の生着および増殖を経時的に観察した。その結果、コントロールと比較するとlncRNA-Smad7をノックダウンしたがん細胞は腫瘍形成能が低下していることが明らかとなった。以上の成果を取りまとめたCancer Science誌に発表した(Arase et al., 2014)。

3) がん幹細胞におけるBMPシグナルの役割と未分化性維持

脳腫瘍患者の予後を改善できる因子が、BMPにより発現変動する遺伝子の中に存在する可能性がある。そこで、グリオブラストーマ患者の臨床検体から単離された脳腫瘍幹細胞を用い、DNA microarrayおよびRNA-seqを用いて、BMP-4により発現変動する遺伝子を網羅的に探索した。脳腫瘍幹細胞では既報の通りBMP-4が分化誘導を行うことを確認した。次に、各候補遺伝子の発現と疾患の予後との相関関係をメタ解析により予測し、TGS-01においてBMP-4により発現変動して、かつ、その変動によって脳腫瘍患者の予後が良好になると予測される遺伝子を複数抽出した。なかでも転写因子Paired homeobox protein 1 (PRRX1)が分化誘導に重要な役割を果たすことを見出した。PRRX1は脳腫瘍幹細胞の未分化性を喪失させること、PRRX1の2つのスプライシングアイソフォームのうちの

一つがCD133陽性の脳腫瘍幹細胞集団を減少させること、このアイソフォームは脳腫瘍幹細胞の腫瘍形成能を抑制することを見出し、PRRX1の脳腫瘍幹細胞分化における役割を明らかにした。

5. 主な発表論文

[雑誌論文] (計5件) (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線、すべて査読あり、*は責任著者)

- 1) Morikawa M, Koinuma D, Mizutani A, Kawasaki N, Holmborn K, Sundqvist A, Tsutsumi S, Watabe T, Aburatani H, *Heldin CH, *Miyazono K. BMP sustains embryonic stem cell self-renewal through distinct functions of different Krüppel-like factors. **Stem Cell Rep.** 2016; 6 (1): 64-73. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.12.004.
- 2) Davis H, Raja E, Miyazono K, Tsubakihara Y, *Moustakas A. Mechanisms of action of bone morphogenetic proteins in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2016; 27: 81-92. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.11.009.
- 3) Arase M, Horiguchi K, Ehata S, Morikawa M, Tsutsumi S, Aburatani H, *Miyazono K, Koinuma D. Transforming growth factor- β -induced lncRNA-Smad7 inhibits apoptosis of mouse breast cancer JygMC(A) cells. **Cancer Sci.** 2014; 105 (8): 974-82. doi: 10.1111/cas.12454.
- 4) *Itoh F, Watabe T, Miyazono K. Roles of TGF- β family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. **Semin Cell Dev Biol.** 2014; 32: 98-106. doi: 10.1016/j.semdb.2014.05.017.
- 5) Ehata S, Yokoyama Y, Takahashi K, *Miyazono K. Bi-directional roles of bone morphogenetic proteins in cancer: another molecular Jekyll and Hyde? **Pathol Int.** 2013; 63 (6): 287-96. doi: 10.1111/pin.12067.

[学会発表] (計7件、うち4件は招待講演)

- 1) Miyazono K. TGF- β signaling in cancer stem cells and EMT. **FASEB Summer Research Conference: The TGF- β Superfamily: Signaling in Development and Disease.** 2013年7月28日～8月2日 Steamboat Spring (Colorado, U.S.A.)
- 2) Miyazono K. EMT and EndMT induced by TGF- β (Keynote Presentation). **UCSF Symposium: Transforming Growth Factor Signaling.** 2013年4月5日～4月6日 Univ. California, San Francisco (San Francisco, U.S.A.)
- 3) 宮園浩平. がんの浸潤と転移の分子機構(若手教育レクチャー). **第104回日本病理学会総会**

2015年4月30日～5月2日 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

- 4) 田邊 諒、岩田 要、宮園浩平. 脳腫瘍幹細胞を治療標的としたBMPによる分化誘導メカニズムの解析. **日本がん分子標的治療学会第19回学術集会** 2015年6月10日～6月12日 松山全日空ホテル (愛媛県・松山市)
- 5) Tanabe R, Iwata C, Miyazono K. Paired related homeobox 1 inhibits the tumorigenic ability of glioma-initiating cells. **TGF- β Meeting in Uppsala.** 2015年8月20日～8月22日 Uppsala University (Uppsala, Sweden)
- 6) 宮園浩平. TGF- β ファミリーシグナルとがん. **第16回運動器科学研究会** 2015年9月11日～9月12日 南日本新聞みなみホール (鹿児島県・鹿児島市)
- 7) Tanabe R, Komuro A, Ino Y, Todo T, Iwata C, Miyazono K. Analyses of the mechanisms underlying BMP-induced differentiation of glioma-initiating cells. **The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association.** 2015年10月8日～10月10日 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

[産業財産権] (計0件)

出願状況 (合計0件)、取得状況 (合計0件)

[その他] (ホームページ)

<http://beta-lab.umin.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮園 浩平 (MIYAZONO, Kohei)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 90209908

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

鯉沼 代造 (KOINUMA, Daizo)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 80375071